

Self-adhesive blotting membrane, useful in nucleic acid hybridization and immunoassay diagnostic tests, has reversible adhesive on the back face

Publication number: DE20215268 (U1)
Publication date: 2003-04-17
Inventor(s):
Applicant(s): EUROIMMUN AG [DE]
Classification:
- **international:** G01N33/543; G01N33/545; G01N33/548; G01N33/543; G01N33/544; (IPC1-7): G01N33/50; C12Q1/68; G01N33/543
- **European:** G01N33/543; G01N33/545; G01N33/548
Application number: DE20022015268U 20021002
Priority number(s): DE20022015268U 20021002

Abstract of DE 20215268 (U1)

Self-adhesive blotting membrane (A) that is provided, on the back, with a reversible adhesive (I). Self-adhesive blotting membrane (A) that is provided, on the back, with a reversible adhesive (I). Blotting device that contains individual (A), reversibly glued, side by side, to a carrier.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Gebrauchsmusterschrift**
(10) **DE 202 15 268 U 1**

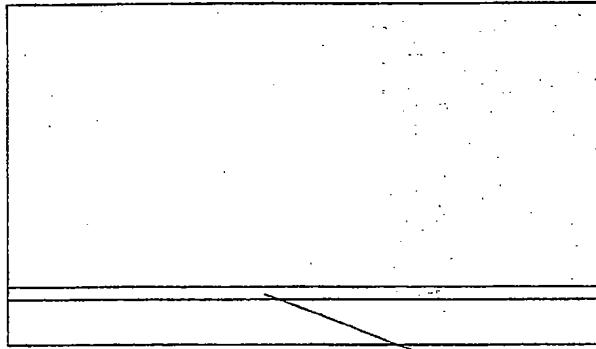
(51) Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/50
G 01 N 33/543
C 12 Q 1/68

(21) Aktenzeichen: 202 15 268.5
(22) Anmeldetag: 2. 10. 2002
(47) Eintragungstag: 17. 4. 2003
(43) Bekanntmachung im Patentblatt: 22. 5. 2003

(73) Inhaber:
Euroimmun AG, 23560 Lübeck, DE

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(54) Selbstklebende Blotmembran
(57) Selbstklebende Blotmembran, die auf der Rückseite mit einem reversiblen Kleber versehen ist.



(1)

DE 202 15 268 U 1

DE 202 15 268 U 1

H 02-10-02

UEXKÜLL & STOLBERG

PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4
D - 22607 HAMBURG

DR. J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)

DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS

DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE

DIPL.-ING. ARNULF HUBER

DR. ALLARD von KAMEKE

DIPL.-BIOL. INGEBORGB VOELKER

DR. PETER FRANCK

DR. GEORG BOTH

DR. ULRICH-MARIA GROSS

DR. HELMUT van HEESCH

DR. JOHANNES AHME

DR. HEINZ-PETER MUTH

DR. MARTIN WEBER-QUITZAU

DR. BERND JANSEN

DR. ALBRECHT von MENGES

DR. MARTIN NOHLEN

MÜNCHEN

DIPL.-ING. LARS MANKE

RECHTSANWALT IN HAMBURG

DR. FRANK DETTMANN

Euroimmun AG
Seekamp 31
23560 Lübeck

25.9.2002

G 61090 We/Gu

Selbstklebende Blotmembran

Die vorliegende Erfindung betrifft eine selbstklebende Blotmembran, die auf der Rückseite mit einem reversiblen Kleber versehen ist.

Das Blotting, d.h. der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Biomolekülen aus einer Agarose- oder Polyacrylamid-Matrix auf eine Membran hat sich seit Mitte der siebziger Jahre zu einem Standardverfahren der molekularen Biologie, insbesondere der molekularen Diagnostik entwickelt.

In Abhängigkeit von der Natur des zu transferierenden Moleküls unterscheidet man im wesentlichen zwischen Southern-Blotting,

DE 200 15 268 U1

HAMBURG: TEL.: (040) 899 654-0 POSTMASTER@UEX.DE FAX: (040) 899 654-88
MÜNCHEN: THOMAS-WIMMER-RING 9, D-80539 MÜNCHEN, TEL.: (089) 29 09 170

H 02·10·02

Northern-Blotting und Western-Blotting. Das sog. Southern-Blotting wurde 1975 erstmals von E. Southern beschrieben. Beim Southern-Blotting werden DNA-Moleküle, die zuvor elektrophoretisch in Polyacrylamid- oder Agarose-Gelen getrennt wurden, üblicherweise mittels Unterdruck auf eine geeignete Membran, wie z.B. eine Nitrocellulose-Membran, transferiert. Nach dem Transfer wird die DNA auf der Membran immobilisiert. Die kovalente Fixierung der DNA kann durch Crosslinking der DNA mit Hilfe von UV-Strahlung oder durch Backen bei einer Temperatur von etwa 80°C erfolgen. Die DNA steht nachfolgend verschiedenen Applikationen, wie beispielsweise der Hybridisierung mit einer einzelsträngigen DNA-Sonde definierter Nukleotidsequenz zur Verfügung. Das Verfahren des Southern-Blottings findet vorzugsweise dann Anwendung, wenn bestimmt werden soll, ob eine definierte Nukleotidsequenz in der genomischen DNA eines Organismus vorliegt oder nicht. Ferner kann das Verfahren bei der Restriktionskartierung eines Gens oder eines Genabschnittes sowie im Rahmen der Aufklärung der Struktur eines Gens, z.B. durch Phagenkartierung, angewendet werden.

In Anlehnung an den Transfer von DNA-Molekülen auf Membranen hat sich für den entsprechenden Transfer von RNA der Name Northern-Blotting etabliert. Das Northern-Blotting unterscheidet sich aufgrund der abweichenden Eigenschaften zwischen RNA und DNA nur geringfügig vom Southern-Blotting. Das Northern-Blotting findet hauptsächlich Anwendung bei Analysen, die die Expression eines bestimmten Gens in verschiedenen Geweben oder Zelllinien auf der Ebene der Transkription qualitativ und/oder quantitativ zu bestimmen suchen. In der Regel verwendet man beim Northern-Blotting Gesamt-RNA-Extrakte oder mittels Oligo(dT)-Affinitätschromatographie angereicherte polyadenylierte mRNA.

Neben den klassischen Southern-Blotting und Northern-Blotting finden zunehmend auch sogenannte Dot-Blotting- und Slot-Blotting-Verfahren Anwendung, bei denen die zu testende Nuklein-

DE 202 15 266 U1

H 02·10·02
3

säure direkt ohne vorhergehende elektrophoretische Trennung in einem Gel auf die Membranen aufgetragen werden.

Der Nachweis spezifischer Proteine bzw. der Nachweis von Antikörpern gegen solche Proteine im Rahmen der molekularen Diagnostik erfolgt in der Regel mit Hilfe des Western-Blotting-Verfahrens. Beim Western-Blotting werden Antigene, Proteine, wie z.B. Glykoproteine oder Enzyme, meist nach elektrophoretischer Trennung in Polyacrylamid-Gelen auf eine geeignete Membran transferiert und immobilisiert. Anhand spezifischer Bindungseigenschaften können diese Proteine mittels Antikörpern, Lektinen oder Enzymsubstraten direkt auf der Membran nachgewiesen werden. Beim Transfer finden verschiedene Verfahren, wie z.B. das Tank-Blotting oder das Semi-dry-Blotting, Anwendung.

Ferner sind in der Proteinanalytik den oben beschriebenen Dot-Blot- oder Slot-Blot-Verfahren analoge Verfahren bekannt, mittels derer spezifische, aufgereinigte Proteine oder Polypeptide einzeln oder als definiertes Gemisch in einer einstellbaren Konzentration auf eine entsprechende Membran aufgebracht werden. Das Aufbringen kann dabei beispielsweise mittels eines Stempels oder berührungs frei mit Hilfe einer Düse erfolgen.

Membranen, die mit einem oder mehreren Proteinen/Polypeptiden als eine Abfolge eng beieinander liegender Tropfen beschichtet wurden, so daß sich für das Auge die Form einer scharf abgegrenzten Linie ergibt, sind in Fachkreisen als sogenannte „Linien-Blots“ bekannt. Dabei ist das Spektrum der verwendbaren Moleküle breiter als beim klassischen Western-Blotting. So können beispielsweise auch Lipide für den nachfolgenden Nachweis mittels Antikörpern auf eine Membran durch die beschriebene Technik aufgebracht werden.

Westernblotmembranen bzw. Linienblotmembranen, die mit definierten Antigenen bzw. einem Spektrum von Antigenen beschichtet wur-

DE 202 15 268 U1

H 02 · 10 · 02
4

den, haben mittlerweile Eingang in die standardmäßig durchgeführte Routinediagnostik gefunden. So lässt beispielsweise der Nachweis bakterieller oder viral er Proteine/Polypeptide durch Inkubation einer entsprechend beschichteten Membran mittels spezifischer Antikörper in Blut- oder Serumproben eines Patienten Rückschlüsse über eine eventuell akute oder zurückliegende bakterielle bzw. virale Infektion zu.

Zum Zweck der Erregerdiagnostik geeignete Protein-beschichtete Membranen sind beispielsweise von der Firma EUROIMMUN kommerziell erhältlich.

Da es sich in den meisten Fällen als ausreichend erweist, nur eine geringe Menge des immobilisierten Biomoleküls mit Hilfe spezifischer Antikörper bzw. spezifischer DNA-Sonden nachzuweisen, werden Blotmembranen aus Kostengründen regelmäßig als Membran-Streifen von nur wenigen Millimetern Breite angeboten. So mit wird gewährleistet, daß der Materialverbrauch gering gehalten wird, da üblicherweise nur eine einzelne Probe (z.B. Blutprobe eines Patienten) mit einer Blotmembran getestet werden soll.

Der Nachweis einer spezifischen Bindung eines Antikörpers oder einer Nukleinsäure-Sonde an das auf der Blotmembran immobilisierte Biomolekül erfolgt in Abhängigkeit der Art des Moleküls in einem mehrstufigen Detektionsverfahren.

Alle bei Southern-Blot, Northern-Blot oder Western-Blot angewandten Detektionsverfahren umfassen Schritte, bei denen die entsprechenden Membranen (oder die Membran-Streifen) mit verschiedenen Wasch- oder Inkubationslösungen versetzt werden. So werden die Membranen beispielsweise zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA-, Casein- oder Tween-enthaltenden Lösungen überschichtet. Diese Lösungen werden im folgenden durch verschiedene Waschlösungen ausgetauscht.

DE 202 15 268 U1

Da alle Inkubationsschritte üblicherweise unter Schwenken des Inkubationsgefäßes (meist eine Kunststoffwanne) durchgeführt werden, hat es sich im Stand der Technik als entscheidender Nachteil erwiesen, daß die Blotmembran frei in der Lösung flottieren kann. Dies kann dazu führen, daß die mit dem entsprechenden Biomolekül beschichtete Seite der Membran sich im Zuge des Befüllens, Entleerens oder Schwenkens des Inkubationsgefäßes nach unten dreht und die beschichtete Seite am Boden oder der Wandung des Gefäßes haftet. Unter diesen Bedingungen ist eine optimale Benetzung der beschichteten Membranseite mit der Inkubationsflüssigkeit nicht mehr gewährleistet. Dies kann zu nur schwer auszuwertenden oder sogar falschen Resultaten bei der Detektion führen.

Ferner kann es beim Absaugen der Inkubationsflüssigkeit (entweder mit einer Pipette oder mittels der Absaugvorrichtung eines Inkubationsautomaten) vorkommen, daß sich die Blotmembran vor die Absaugöffnung legt und diese verstopft. Dadurch kann die auszutauschende Lösung nicht effizient durch die neue Inkubationslösung ersetzt werden, was ebenfalls zu falschen Resultaten bei der Detektion führen kann. Sofern die Inkubationsgefäße manuell entleert werden, droht außerdem die Gefahr, daß die Membran zusammen mit der auszutauschenden Inkubationslösung aus dem Inkubationsgefäß geschüttet wird, was eventuell eine Kontamination der Membran nach sich zieht.

Die im Stand der Technik bekannten Nachteile herkömmlicher Blotmembran gelten insbesondere für dünne Membranstreifen, die aufgrund ihres geringen Gewichtes und der damit verbundenen Beweglichkeit in den entsprechenden Inkubationslösungen einer besonders hohen Gefahr unterliegen, an der Gefäßwandung zu haften oder mit der Inkubationslösung verworfen zu werden.

H 02 · 10 · 02
6

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war somit die Bereitstellung von Mitteln, durch die die oben beschriebenen Nachteile aus dem Stand der Technik im Rahmen der Detektion von auf Membranen immobilisierten Biomolekülen ausgeräumt werden und mit deren Hilfe es durch die Vermeidung von Artefakten zu einer Erhöhung der Sicherheit der entsprechenden Ergebnisse kommt.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch eine selbstklebende Blotmembran gelöst, die auf der Rückseite mit einem reversiblen Kleber versehen ist.

Der reversible Kleber auf der Rückseite der erfindungsgemäßen Blotmembran erlaubt, die Membran unmittelbar am Boden des Inkubationsgefäßes zu fixieren, wodurch ein Umdrehen dieser Membran durch das Befüllen, Entleeren oder Schwenken des Gefäßes im Verlauf der Inkubation verhindert wird. Dabei kann der reversible Kleber über die gesamte Ausdehnung der entsprechenden Blotmembran-Rückseite aufgetragen sein oder sich nur auf einen abgegrenzten Bereich der Blotmembran-Rückseite beschränken (z.B. in Form eines oder mehrerer Punkte oder Streifen).

Unter einem reversiblen Kleber wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Kleber verstanden, der reversibel klebende Eigenschaften besitzt, d.h. die mit dem Kleber versehenen Blotmembranen lassen sich nach dem Kontakt mit einer selbst nichthaftenden Oberfläche (z.B. dem Boden eines Reaktionsgefäßes aus Kunststoff oder Glas) von dieser Fläche entfernen, ohne dabei ihre haftende Eigenschaft zu verlieren. Somit erlaubt ein reversibler Kleber auf der Rückseite einer Blotmembran das mehrfache Anhaften und Ablösen derselben auf bzw. von diesen nichthaftenden Oberflächen. Der reversible Kleber wird nachfolgend auch als Haftkleber bezeichnet.

Die mit dem reversiblen Kleber versehene Blotmembran verliert auch dann ihre haftenden Eigenschaften nicht, wenn sie über ei-

DE 202 15 266 U1

H 02 · 10 · 02

nen längeren Zeitraum mit wäßrigen Lösungen, wie z.B. salzhaltigen Inkubationslösungen, benetzt und/oder überschichtet wird. Dadurch wird es beispielsweise möglich, die entsprechende Blotmembran im Zuge der Detektion nacheinander in verschiedenen Reaktionsgefäßern zu fixieren und nach Abschluß des Detektionsverfahrens in ein geeignetes Protokoll- bzw. Laborbuch oder ein Datenblatt einzukleben.

Der auf der Rückseite der erfundungsgemäßen Blotmembran aufgebrachte reversible Kleber ermöglicht somit, daß die Membran während des gesamten Detektionsverfahrens auch bei mehrfachem Wechsel der Inkubationslösungen und/oder der Inkubationsgefäße an einer vorgesehenen Stelle des jeweiligen Inkubationsgefäßes verbleibt und ein Ausgießen bzw. das Umdrehen oder ein Anhaften der Membran mit seiner Vorderseite (d.h. die Seite, auf der das jeweilige Biomolekül aufgebracht wurde) an eine Wandung des Reaktionsgefäßes oder ähnliches verhindert wird.

Als reversibler Kleber kann im Rahmen der Erfindung jeder Kleber Anwendung finden, der ein mehrfaches Ablösen und Wiederaufkleben der mit dem Kleber versehenen Membran auf eine nicht-haftende Oberfläche (z.B. aus Glas oder Kunststoff) erlaubt. Der bevorzugte Arbeitsbereich des reversiblen Klebers kann zwischen 20°C und 25°C betragen. Er sollte jedoch auch bei höheren Temperaturen, wie beispielsweise 50°C-65°C oder mehr, eine stabile Haftwirkung zeigen. Solche reversiblen Kleber sind dem Fachmann bei der Herstellung von Etiketten oder sogenannten Haftmarkern (z.B. Post-it[®]) bekannt und umfassen z.B. den Kleber „Creativ Mount“ der Firma 3M. „Creativ Mount“ verliert auch bei Temperaturen, die üblicherweise im Rahmen einer Nukleinsäure-Hybridisierung angelegt werden (ca. 60°-80°), seine Haftwirkung nicht. Die verwendeten Klebstoffe werden üblicherweise als „Haftkleber“ bezeichnet. Vorzugsweise wird ein Klebstoff verwendet, der ein Ablösen der Membran erlaubt, ohne daß es dabei zu Beschädigungen der Membran kommt.

DE 202 15 268 U1

H 02 · 10 · 02

Der reversible Kleber kann entweder direkt auf die Rückseite der laminierten Membran aufgebracht sein oder z.B. in Form eines doppelseitigen Klebebands vorliegen.

Erfindungsgemäß kann die Blotmembran auf der Vorderseite ein Antigen oder ein Antigenspektrum aufweisen. Als Antigen wird im Rahmen der Erfindung jedes biologische Molekül bezeichnet, das sich mittels seiner Bindung an einen Antikörper spezifisch nachweisen lässt. Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei diesem Antigen um ein Protein, ein Lipid, eine Nukleinsäure (DNA/RNA), ein Kohlenhydrat, ein komplexes Molekül (wie z.B. ein Molekül, das einen Protein- und/oder einen Kohlenhydrat- und/oder einen Lipidanteil aufweist, wie z.B. Ganglioside etc.) und/oder ein Allergen. Unter einem Allergen wird vorliegend jede Substanz verstanden, die in der Lage ist, im menschlichen oder tierischen Körper Überempfindlichkeitsreaktionen (sowohl vom Sofort- als auch vom verzögerten Typ) sowie eine spezifische, Antikörper-vermittelte Immunreaktion auszulösen. Beim Nachweis von Antikörpern gegen Nukleinsäuren in Patientenproben, wie z.B. beim Nachweis des systemischen Lupus erythematodes, einer Autoimmunkrankheit, die sich u.a. durch das Vorkommen eines Antikörpers gegen doppelsträngige DNA auszeichnet, kann es sich bei dem Antigen, welches auf die Vorderseite der erfundungsgemäßen Blotmembran aufgetragen wird, um einzelsträngige oder doppelsträngige DNA bzw. um RNA handeln.

Da die erfundungsgemäßen Blotmembranen bei Verwendung der wässrigen Inkubationslösungen auch im durchtränkten Zustand klebende Eigenschaften aufweisen, hat es sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung als unerheblich erwiesen, ob zunächst die Blotmembran in das Reaktionsgefäß eingebracht wird oder ob die Blotmembran erst nach Vorlegen der entsprechenden Inkubationsflüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes befestigt wird.

DE 202 15 266 U1

H 02 · 10 · 02

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die Vorderseite der Blotmembran ein oder mehrere Protein-Antigene auf. Bei diesen Proteinen kann es sich um einzelne, isolierte Proteine, wie z.B. um erregerspezifische Proteine, wie beispielsweise affinitätsgereinigtes Herpes-simplex-Virus-2 typenspezifisches Glykoprotein G2 (gG 2), Epstein-Barr-Virus-Capsid-Antigen oder um definierte Gemische aus mehreren Proteinen, wie z.B. Protein-Antigen-Extrakte aus Helicobacter pylori-Stämmen handeln. Die Proteine können aus den entsprechenden Erregerstämmen gereinigt werden (native Antigene) oder in Wirtszellen exprimiert und anschließend aufgereinigt werden (rekombinante Antigene).

Ferner kann es sich bei den Proteinen um humane Antigene handeln, mittels derer sich Antikörper in Patientenserien nachweisen lassen, die auf eine Autoimmunerkrankung verweisen. So kann auf die erfindungsgemäßen Blotmembranen z.B. lösliches Leber-Antigen/ Leber-Pankreas-Antigen (SLA/LP), natives Thyreoglobulin, rekombinante Schilddrüsenperoxidase oder Kombinationen derselben aufgebracht werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die Blotmembran auf ihrer Vorderseite das Proteinspektrum eines menschlichen oder tierischen Gewebes, einer Zelllinie oder eines Infektionserregers, aus Lebensmitteln oder Pollen (Allergene) auf, das elektrophoretisch entsprechend seinen Molekularmassen in einem denaturierendem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Western-Blotting auf die Membran transferiert wurde. Als „Proteinspektrum“ wird vorliegend die gesamte Proteinfaktion der jeweiligen Zellen oder des jeweiligen Zellkompartiments verstanden, die nach deren Lyse unmittelbar für die elektrophoretische Trennung zur Verfügung steht. Dabei kann die jeweilige Probe auch andere Moleküle wie Lipide oder Nukleinsäuren enthalten, da diese sich im nachfolgenden Blot nicht als störend erweisen.

DE 202 15 266 U1

H 02 · 10 · 02
10

Bei den Antigenen, die aus tierischen Geweben isoliert werden, kann es sich beispielsweise um Proteine aus dem Gift von Bienen und Wespen handeln, die bei manchen Menschen zu äußerst heftigen allergischen Reaktionen führen. Die Gifte können nach im Stand der Technik hinreichend bekannten Verfahren, z.B. durch Giftsackextraktion nach Gefriertrocknen von Wespen, oder durch Elektrostimulation lebender Bienen, gewonnen werden.

Bei den Geweben kann es sich erfindungsgemäß beispielsweise um hepatisches Gewebe, neuronales Gewebe, z.B. aus dem Kleinhirn, oder Gewebe aus dem Pankreas, der Niere, dem Auge, dem Innenohr oder der Haut handeln. Diese Gewebe können nach im Stand der Technik hinreichend bekannten Verfahren aus Säugetieren, beispielsweise aus Primaten oder Menschen, isoliert werden. Die Isolierung der Proteinfraktion erfolgt in der Regel durch die Lyse der Zellen (z.B. durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder Aufkochen) oder durch Homogenisieren des Gewebes und Aufnahme in einen geeigneten Puffer sowie ggf. einer Aufreinigung und/oder Aufkonzentrierung der gewünschten Proteine/Polypeptide.

Bei der Zelllinie kann es sich um jede etablierte Zelllinie handeln, die ein oder mehrere für diese Zelllinie spezifische Proteine bildet. Bevorzugt handelt es sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung um humane Zelllinien, zum Beispiel um Zelllinien, die ein oder mehrere spezifische Proteine für maligne und benigne Tumoren exprimieren. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Zelllinie um eine humane Epitheliomzelllinie oder die HeLa-Zelllinie (ATCC CCL 2; Gey et al. (1952) *Cancer Res.* 12, 264; Scheper et al. (2002) *Autoimmunity reviews*, Vol.1, Issues 1-2, S. 17 „Anti-Mi-2 Westernblot: A new test for serological detection of myositis autoantibodies“). Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der humanen Epitheliomzelllinie

DE 202 15 266 U1

H 02.10.02
11

um die humane Epitheliomtyp 2-Zelllinie HEp-2 (ATCC CCL 23, Moore et al. (1955) Cancer Res. 15, 598). Die Gewinnung der Proteinfraktion aus diesen Zelllinien erfolgt nach im Stand der Technik hinreichend bekannten Verfahren, wobei die Lyse der Zellen entsprechend ihrer Herkunft modifiziert werden kann.

Bei den Infektionserregern kann es sich um jeden pathogenen Infektionserreger, wie Bakterien, Viren oder Eukaryonten, handeln. Vorzugsweise sind diese Infektionserreger bzw. Antikörper gegen diese Erreger in Körperflüssigkeiten, wie Serum, Blut, Plasma, Gelenkpunktat, Urin und Liquor nachweisbar. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Infektionserregern im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise um humanpathogene Borrelien, wie z.B. *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii*) sowie andere humanpathogene Infektionserreger, wie z.B. *Echinococcus granulosus*, *Epstein-Barr-Virus (EBV)*, *Helicobacter pylori*, *Hepatitis-Viren*, *Herpes simplex-Virus (HSV)*, *Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)*, *Treponema pallidum*, *Yersinia enterocolitica* oder das *Zytomegalie-Virus (CMV)*. Die Relevanz von Protein-Antigenen im Rahmen der Diagnostik von Borrelien ist im Stand der Technik hinreichend beschrieben (vgl. beispielsweise Ma et al., Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by Western Immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. Feb./1992: 370-376; Tilton und Ryan, The laboratory diagnosis of Lyme disease. J. Clin. Immunoassay. 16: 208-214 (1993); Hauser et al., Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato. J. Clin. Microbiol. June/1997: 1433-1444; Wilske et al., MiQ 12/2000 Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik: Lyme-Borreliose. Urban & Fischer Verlag. München, Jena. (2000)).

DE 20215268 U1

H 02 · 10 · 02
12

Die Gewinnung der Proteine aus diesen Infektionserregern erfolgt nach im Stand der Technik hinreichend bekannten Verfahren. Bei der Lyse bakterieller Zellen kann dies beispielsweise durch enzymatischen Abbau der Zellwand mittels Lysozym oder Lysostaphin (bei *Staphylococcus*-Arten) erfolgen.

Der Nachweis der Antikörper-Bindung an die entsprechenden Antigene (z.B. Proteine) kann vorliegend unter Verwendung von Methoden durchgeführt werden, die im Stand der Technik hinreichend beschrieben sind (vgl. F. Lottspeich, H. Zorbas „Bioanalytik“, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998). So kann beispielsweise der zur Detektion vorgesehene Antikörper direkt mit einem Molekül gekoppelt ("markiert") werden, das den Nachweis des Antikörpers und (damit auch des gebundenen Antigens) ermöglicht. Derartig zur Markierung geeignete Moleküle, die in der Regel kovalent an den Antikörper gebunden werden, sind auf dem Gebiet der molekularen Diagnostik in großer Anzahl beschrieben und umfassen u.a. Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise Fluorescein-Iothiocyanat oder Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat, Lumineszenzfarbstoffe sowie radioaktiv markierte Moleküle. Daneben können auch Antikörper verwendet werden, die mit entsprechenden, zur Markierung geeigneten Molekülen komplexiert werden (z.B. Goldpartikel).

Auch Enzyme, mittels derer sich bestimmte chromogene Substrate bzw. Substrate, deren Umsetzung in geeigneter Weise mit einer Veränderung (z.B. Oxidation) eines chromogenen Moleküls einhergehen, umsetzen lassen, kommen vorliegend als nachweisbare Moleküle in Betracht. So kann der erfundungsgemäße Antikörper beispielsweise mit einer Peroxidase, wie beispielsweise einer Horse-Radish-Peroxidase (HPR), oder einer Phosphatase, wie beispielsweise einer alkalischen Phosphatase, gekoppelt werden. Der Nachweis eines Reaktionskomplexes, der aus dem markierten Antikörper und dem gebundenen Antigen besteht, erfolgt in Abhängigkeit des Moleküls, das zur Markierung des Antikörpers gewählt

DE 202 15 268 U1

H 02 · 10 · 02
13

wurde. Verfahren zur Markierung von Antikörpern sind dem auf dem Gebiet tätigen Fachmann bekannt und bedürfen keiner weiteren Erläuterung.

Alternativ kann der Reaktionskomplex auch in einem zweistufigen Verfahren mit Hilfe von sekundären Antikörpern nachgewiesen werden. Dabei wird ein primärer, an das Antigen bindender, bestimmter unmarkierter Antikörper mit einem zweiten, markierten Antikörper inkubiert, der mit einem entsprechenden nachweisbaren Molekül gekoppelt ist und sich gegen den primären Antikörper richtet. Anschließend wird der sekundäre Antikörper anhand des zur Markierung dienenden, gekoppelten Moleküls nachgewiesen. Bei diesem indirekten Nachweisverfahren können wiederum die oben erwähnten Moleküle zur Markierung verwendet werden. Dieses zweistufige Nachweisverfahren ist erheblich empfindlicher als der direkte Nachweis des Antikörpers, da mehrere markierte sekundäre Antikörper an den primären Antikörper binden können (Signalverstärkung).

Ein solches zweistufiges Nachweisverfahren wird u.a. bei der serologischen Untersuchung von Patienten im Rahmen der Erregerdiagnostik oder bei der Diagnose von pathologischen Zuständen, die auf Autoantikörper zurückzuführen sind, verwendet. Dabei wird das auf der Membran befindliche Protein-Antigen bzw. das Spektrum der Protein-Antigene dazu verwendet, das Vorliegen entsprechend spezifischer Antikörper in der Probe (z.B. Serum, Plasma, Blut, Urin, Gelenkpunktat, Liquor o.ä.) zu untersuchen. Der an ein Antigen gebundene Antikörper aus dem Patientenserum wird anschließend mit einem markierten Anti-human-Antikörper nachgewiesen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die Blotmembran auf der Vorderseite eine oder mehrere Nukleinsäuren zur Hybridisierung auf. Dabei kann es sich um genomische DNA, Plasmid-DNA oder um durch Re-

DE 202 15 268 U1

striktionsenzyme fragmentierte DNA oder Oligonukleotide handeln. Die DNA kann unter Verwendung von herkömmlichen Southern-Blotting-Verfahren aus Agarose-Gelen oder Polyacrylamid-Gelen auf die Blotmembran transferiert und nachfolgend durch Backen oder UV-Crosslinking immobilisiert werden. Ferner ist es möglich, die DNA durch Dot-Blotting auf die Membran aufzubringen, beispielsweise durch Pipettieren von entsprechend verdünnten DNA-Lösungen direkt auf die Membran oder durch Auftragen mit Hilfe eines Stempels oder einer Düse. Die auf der Blotmembran immobilisierte DNA kann anschließend mit sequenzspezifischen, markierten Sonden, z.B. mit Digoxigenin-11-dUTP 3'-markierten Oligonukleotiden, hybridisiert werden. Entsprechende Hybride lassen sich nach im Stand der Technik hinreichend bekannten Verfahren visualisieren (beispielsweise durch Nachweis der Digoxigenin-haltigen Hybride mittels Chemilumineszenz-Detektion nach Zugabe von Dinatrium 3-(4-Methoxy-spiro{1,2-Dioxetane-3,2'-(5'-Chlor)Tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] Decan}-4-yl)-Phenylphosphat (CSPD; vgl. „The DIG System User's Guide for Filtration Hybridization“, Boehringer Mannheim, 1995)).

Alternativ kann es sich bei der auf der Blotmembran immobilisierten Nukleinsäure um RNA-Moleküle handeln. So werden beispielsweise Gesamt-RNA-Präparationen aus verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten, wie z.B. aus dem Gehirn, aus Tumoren der Brust oder des Uterus usw., kommerziell angeboten (beispielsweise „Multiple Tissue Northern Blots“, erhältlich bei Sigma Aldrich). Der Nachweis von auf der Blotmembran immobilisierten RNA-Molekülen bzw. Teilen derselben erfolgt, wie für DNA beschrieben, mittels herkömmlicher Verfahren, wie z.B. der Digoxigenin-Detektion.

Die gebräuchlichen Nachweisverfahren für DNA- bzw. RNA-Hybride umfaßt ähnlich dem Western-Blotting mehrere Wasch- bzw. Inkubationsschritte, bei denen die Blotmembran mit verschiedenen Waschlösungen und/oder Inkubationslösungen versetzt wird. Es hat

DE 202 15 268 U1

sich erfindungsgemäß daher auch bei diesen Nachweisverfahren als vorteilhaft erwiesen, die Blotmembran während der unter Schwenken/Schütteln durchgeföhrten Inkubation an den Boden des jeweiligen Reaktionsgefäßes zu fixieren.

Im Rahmen der Erfindung können in Abhängigkeit des zu detektierenden Moleküls Blotmembranen aus unterschiedlichen Materialien verwendet werden. Bevorzugt bestehen diese Membranen aus Nitrocellulose, Nylon, Polyethersulfon oder Polyvinyliden-difluorid oder Glasfaser-Material. Im Rahmen der Erfindung können ferner Membranen verwendet werden, deren Oberfläche modifiziert ist. Bevorzugt werden Membranen verwendet, deren Ladung den Antigenen angepaßt ist, wodurch eine verbesserte Bindung der Antigene an die Membranen gewährleistet ist. Durch Verwendung von positiv oder negativ geladenen Membranen wird die Bindung von entsprechend negativ oder positiv geladenen Antigenen verbessert, während ungeladene Membranen Antigene ladungsunabhängig und somit auch Antigengemische mit verschiedenen Ladungen zu binden vermögen. Weiterhin können die verwendeten Membranen hydrophob sein oder durch eine variable Porengröße unterschiedliche Bindungseigenschaften für verschiedene Antikörper/Antigene aufweisen. In einer weiteren Ausführungsform bestehen die Membranen aus einem Material, an das Antigene kovalent binden (z.B. die Immunodyne® ABC Membran (Pall), eine Nylonmembran mit kovalenter Bindungsaktivität, bzw. die UltraBind®-Membran (Pall), eine Polyethersulfonmembran mit funktionellen Aldehydgruppen zur Ausbildung von Schiff-schen Basen mit primären Aminogruppen in Proteinen). Die kovalente Bindung der Antigene an die Membranen erfolgt durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

Die Membranen können erfindungsgemäß zur Erhöhung ihrer Stabilität und zur verbesserten Handhabung auf einen entsprechend geeigneten Polymerträger, wie z.B. eine Polymerfolie aus Polyester, feinen Geweben, o.ä. laminiert werden. Verfahren der

DE 202 15 268 U1

Laminierung sind im Stand der Technik umfassend beschrieben und dem Fachmann daher hinreichend bekannt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird eine aus Nitrocellulose bestehende Blotmembran auf eine Polymerfolie laminiert.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die beschriebenen Blotmembranen auf einen geeigneten Träger reversibel aufgeklebt. Der Träger soll dazu dienen, die Blotstreifen zu fixieren und in einer für den Fachmann einfach zu handhabenden Anordnung, vorzugsweise parallel nebeneinanderliegend, bereitzustellen. Vorzugsweise handelt es sich bei den Membranen um streifenförmige Membranen von geringer Breite. Die Membranen können somit ähnlich einem Zündholzbrief nebeneinander angeordnet werden und können unmittelbar vor ihrer Verwendung problemlos von diesem Träger entfernt werden. Die Handhabung der Streifen wird folglich enorm erleichtert, da diese nicht mehr mit einer Pinzette aus einem Glas- oder Kunststoffgefäß entnommen werden müssen, was in der Regel zu einer elektrostatischen Aufladung der Membran oder sogar zur Zerstörung derselben führt (insbesondere bei Verwendung fragiler Nitrocellulose-Membranen).

Die Anzahl der auf dem Träger und vorzugsweise nebeneinander angeordneten Membranen kann grundsätzlich beliebig ausgewählt werden, beträgt jedoch aus Gründen der besseren Handhabbarkeit üblicherweise zwischen 5 und 40, vorzugsweise 8, 16, 24 oder 30. Der Träger, auf den die Blotmembran-Streifen aufgeklebt werden, besteht beispielsweise aus Kunststoff oder (beschichteter) Pappe (wie z.B. beschichtetem Karton) und weist mindestens die räumlichen Ausmaße der entsprechenden Blotmembranen auf. Er sollte vorzugsweise von einer hinreichend mechanischen Stabilität sein, um dem in der Regel fragilen Membran-Streifen entsprechend Schutz bieten zu können.

Figuren

Figur 1: Herstellen der erfindungsgemäßen Blotmembranstreifen.

- a) Auftragen des reversiblen Klebers auf die Membranrückseite
- b) Ansicht der Vorderseite der Membran nach Zerteilen der Membran in einzelne Streifen
- c) Ansicht der Rückseite der Membran nach Zerteilen der Membran in einzelne Streifen

Figur 2: Fixierung und nachfolgende Inkubation der erfindungsgemäßen Blotmembranstreifen in einer Inkubationswanne, die für die gleichzeitige Inkubation mehrerer Streifen ausgelegt ist.

- a) Aufsicht auf die Inkubationswanne mit mehreren Inkubationsrinnen
- b) Seitenansicht des in der Wanne fixierten Blotmembranstreifens sowie vergrößerter Ausschnitt der Kontaktstelle, an der die Blotmembranstreifens mittels des Haftklebers mit dem Boden der Inkubationswanne in Verbindung stehen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen beschrieben.

Beispiele

1. Fertigung von Anti-HSV Westernblot-Streifen

Die Antigenen eines Vollextrakts von Herpes simplex 1 Viren werden mittels diskontinuierlicher Polyacrylamidgelektrophorese nach Molekularmasse getrennt. Anschließend erfolgt der Transfer

DE 202 15 268 U1

der Antigene mittels eines Tankblotting-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran. Kontrollbande und affinitätschromatographisch gereinigtes Glykoprotein G2 von HSV-2 werden linienförmig auf die Membran aufgetragen und ein Etikett mit Chargenbezeichnung aufgeklebt. Die Nitrozellulosemembran wird mit einem selbstklebenden Polyesterträger verstärkt und auf der Rückseite mit einem reversiblen Sprühkleber (Creative Mount) beschichtet. Die polymerverstärkte selbstklebende Nitrozellulosemembran wird abschließend maschinell in 2 mm breite Teststreifen zerteilt und die Streifen in eine Transportverpackung eingeklebt.

2. Verwendung der Blotmembranstreifen

Der Anwender entnimmt je zu untersuchendes Patientenmaterial (Serum, Plasma oder andere Körperflüssigkeiten) einen Teststreifen aus der Verpackung und klebt den Streifen über den reversiblen Kleber auf der Rückseite in die Inkubationsrinne ein. Anschließend erfolgt die Inkubation nach Testanleitung (Auszug aus der Testanleitung Anti-HSV Westernblot EUROIMMUN AG).

Blockierung: Die Inkubationsrinnen entsprechend der Zahl der zu untersuchenden Serumproben mit je 1,5 ml UniversalpufferPlus füllen. Die benötigte Menge an Blotstreifen mit einer Pinzette der Verpackung entnehmen und direkt in je eine mit Puffer gefüllte Inkubationsrinne kleben. Die Nummer auf dem Streifen muß lesbar sein. 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubieren. Anschließend die Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig abziehen.

Proben-Inkubation: In jede mit einem Blotstreifen gefüllte Inkubationsrinne 1,5 ml der verdünnten Serumproben füllen und 30 Minuten auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.

H 02·10·02

19

Waschen: Flüssigkeit aus jeder Rinne vollständig abziehen und 3 x 5 Minuten mit je 1,5 ml UniversalpufferPlus auf einem Wippschüttler waschen.

Konjugat-Inkubation: Jeweils 1,5 ml Enzymkonjugat-Lösung (Alkalische-Phosphatase-markiertes Anti-Human-IgG) in die Inkubationsrinnen pipettieren und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.

Waschen: Flüssigkeit vollständig aus den Rinnen abziehen. Waschen wie oben.

Substrat-Inkubation: Jeweils 1,5 ml Substratlösung in die Inkubationsrinnen pipettieren. 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubieren.

Stoppen: Flüssigkeit aus jeder Rinne vollständig abziehen und jeden Blotstreifen 3 x 1 Minute mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen.

Auswertung: Die inkubierten Blotstreifen in das Auswerte-Protokoll einkleben und vorsichtig mit saugfähigem Papier abtupfen. Die Auswerte-Schablone an die aufgeklebten Blotstreifen halten und so ausrichten, daß der schwarze Balken über der Nummer des Blotstreifens mit dem Anlegebalken auf der Auswerte-Schablone eine Linie bildet. Die Chargenbezeichnung auf der Auswerte-Schablone muß mit der Chargenbezeichnung auf den Blotstreifen übereinstimmen. Deutlich erkennbare Banden auf den Blotstreifen, die mit den Markierungen auf der Auswerte-Schablone übereinstimmen, werden in das Auswerte-Protokoll eingetragen.

DE 202 15 268 U1

02.03.03
19a

Figuren

Figur 1a: Westernblotmembran (Rückseite)

Figur 1b: Westernblotmembran-Streifen (Vorderseite)

Figur 1c: Westernblotmembran-Streifen (Rückseite)

Figur 2a: Westernblotmembran-Streifen in der Inkubationswanne
(Aufsicht)

Figur 2b: Westernblotmembran-Streifen in der Inkubationswanne
(Seitenansicht sowie Ausschnittsvergrößerung)

Bezugszeichen:

(1): reversibler Kleber

(2): Westernblot-Streifen

(3): Feld zum Aufdruck von Produktspezifikationen, z.B.
Chargennummer

(4): Inkubationswanne

(5): Westernblot-Streifen, die mittels Kleber in der
Wanne fixiert sind

DE 202 15 268 U1

H 02 · 10 · 02

20

Schutzansprüche

1. Selbstklebende Blotmembran, die auf der Rückseite mit einem reversiblen Kleber versehen ist.
2. Blotmembran nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Vorderseite ein Antigen oder ein Spektrum von Antigenen aufgebracht ist.
3. Blotmembran nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen ein Protein, Lipid, Allergen, Kohlenhydrat, zuckerhaltige Strukturen und/oder eine Nukleinsäure ist.
4. Blotmembran nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Vorderseite ein oder mehrere Proteine aufgebracht sind.
5. Blotmembran nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie auf der Vorderseite ein Proteinspektrum eines Tieres, eines Menschen, eines Gewebes, einer Zelllinie, eines Infektionserregers, eines Allergens, wie Lebensmittel oder Pollen, aufweist.
6. Blotmembran nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe aus der Leber, dem Kleinhirn, dem Pankreas, der Niere, dem Auge, dem Innenohr oder der Haut ist.
7. Blotmembran nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelllinie eine humane Epitheliomzelllinie oder die He-La-Zelllinie ist.
8. Blotmembran nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die humane Epitheliomzelllinie die humane Epitheliomtyp 2-Zelllinie HEp-2 ist.

DE 202 15 268 U1

H 02-10-02

21

9. Blotmembran nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Infektionserreger humanpathogene Borrelien und andere humanpathogene Infektionserreger umfaßt.
10. Blotmembran nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den humanpathogenen Borrelien um *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii*) handelt.
11. Blotmembran nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den humanpathogenen Infektionserregern um *Echinococcus granulosus*, Epstein-Barr-Virus (EBV), *Helicobacter pylori*, Hepatitis-Viren, Herpes simplex-Virus (HSV), Humanes Immundefizienz-Virus (HIV), *Treponema pallidum*, *Yersinia enterocolitica* oder das Zytomegalie-Virus (CMV) handelt.
12. Blotmembran nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie auf der Vorderseite ein oder mehrere Nukleinsäuren zur Hybridisierung aufweist.
13. Blotmembran nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Nitrocellulose, Nylon, Polyethersulfon oder Polyvinylidenfluorid besteht.
14. Blotmembran nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Nitrocellulose besteht und vliesverstärkt ist und/oder auf einen Polymerträger laminiert ist.
15. Blotmembran-Anordnung, die Blotmembranen nach den Ansprüchen 1 bis 13 enthält, bei der die einzelnen Blotmembranen nebeneinander auf einem geeigneten Träger reversibel aufgeklebt sind.

DE 202 15 268 U1

H 02·10·02

22

16. Blotmembran-Anordnung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Blotmembranen Streifen von geringer Breite sind.

DE 202 15 268 U1

07.03.03

1/2

Fig. 1a:

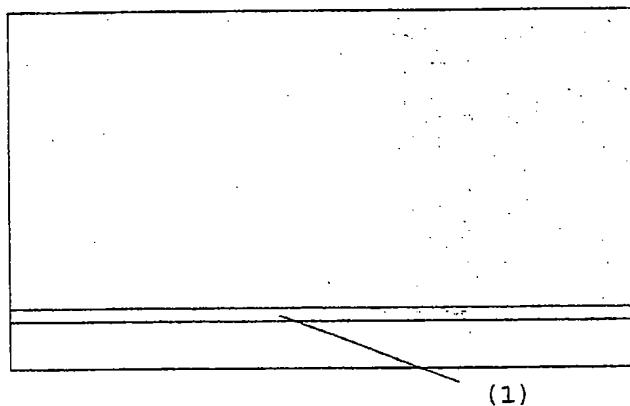


Fig. 1b:

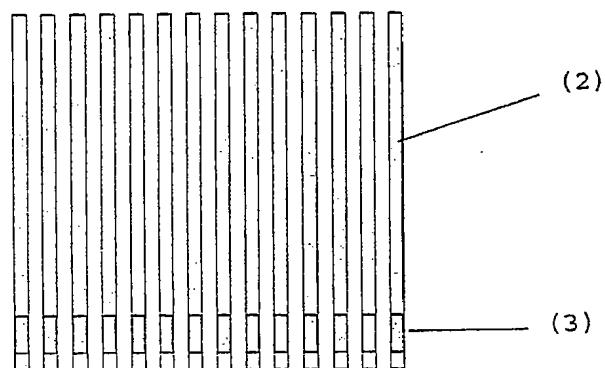
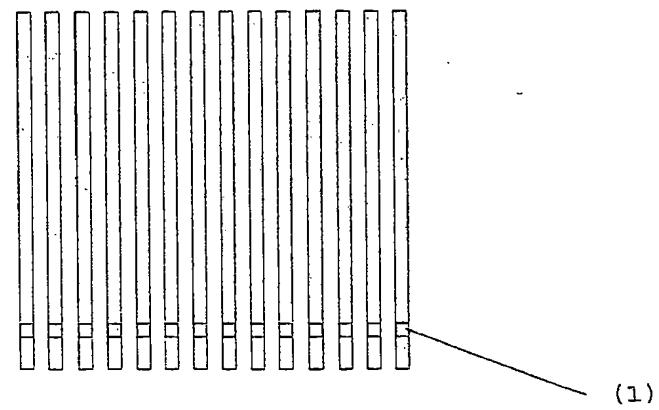


Fig. 1c:



DE 202 15 268 U1

07.03.03

2/2

Fig. 2a:

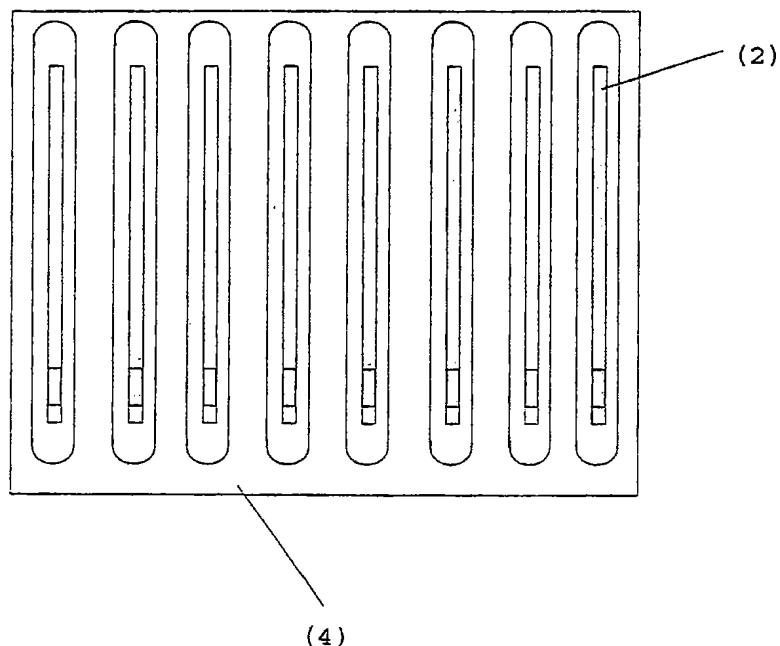
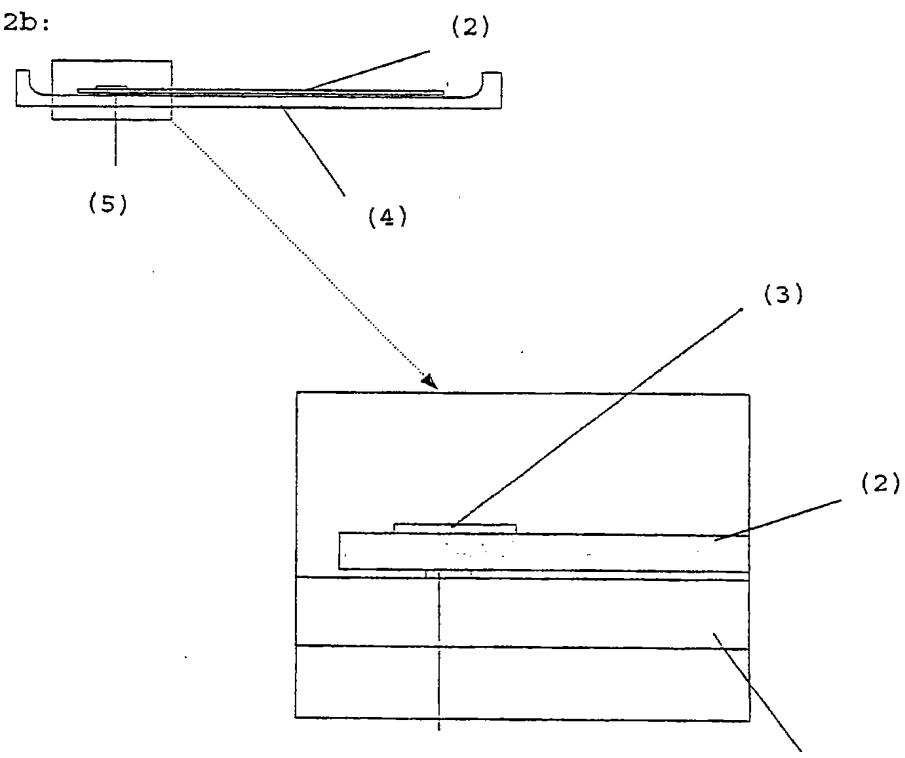


Fig. 2b:



DE 202 15 268 U1 (4)